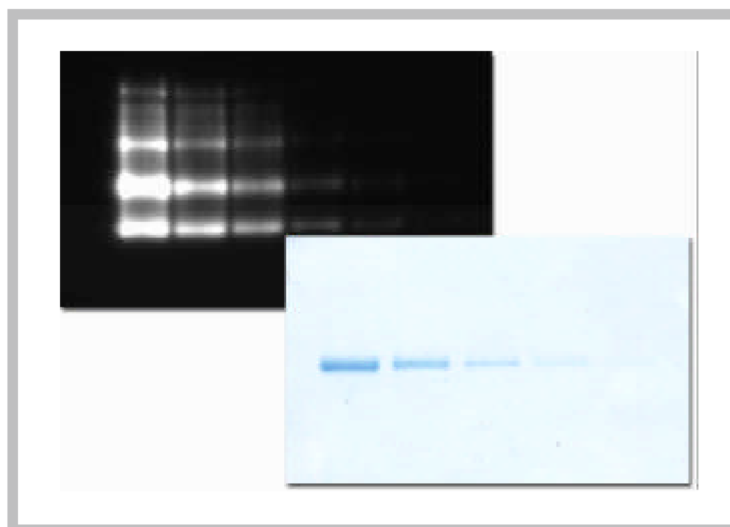
ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY

Western Blotting

ウエスタンブロッティング の コツ



ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY

1．ウエスタンブロッティング

電気泳動で分離したゲル中のタンパク質を膜（メンブラン）に移す方法をウエスタンブロッティング（Western Blotting）と言っています。わざわざ膜に移すのは、抗原抗体反応等を利用して特異的検出（目的のタンパク質だけを検出）を行なう為。ゲルのままではせっかく分離した試料（タンパク質）が検出反応中に拡散してしまったり、抗体がゲルの中に入っていって反応するのに時間を要したり、その溶液容量も多量に必要となってきたり・・・。膜上なら試料（タンパク質）は固定され、抗体は膜表面の試料（タンパク質）と反応でき、その溶液容量も少量ですみ時間も短縮できます。ゲルの様に破損する心配もありません。

－操作の流れ－

電気泳動
↓
ウエスタンブロッティング
↓
抗原抗体反応 etc
↓
発色検出・撮影
↓
解析

さて、この便利なウエスタンブロッティングの手法が発表されたのが１９７９年。ＤＮＡをブロッティングするのがサザン（Southern）だから、とタンパク質→ウエスタン と命名されました。検出まで含めてウエスタンブロッティング、ウエスタン法と呼ぶこともあります。従来このＴｏｗｂｉｎの方法、均一溶液中で電気泳動的にブロッティングする手法が一般的でしたが、１９８４年Ｋｙｈｓｅ-Ａｎｄｅｒｓｅｎのろ紙にブロッティング溶液を染み込ませて積層するセミドライ式という方法が発表されてから、操作性・経済性の面で広く受け入れられ最近ではこちらが主流になりつつあります。

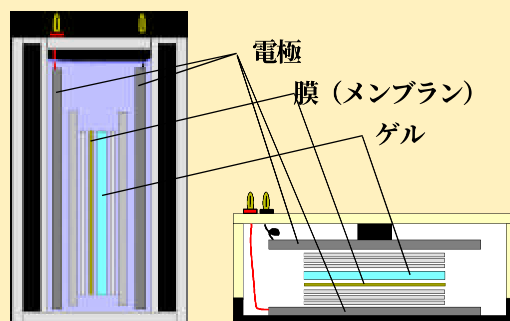
*Kyhse-Andersen, J. (1984) J. Biochem Biophys. Methods, 10, 203-209.

2．装置

通常タンパク質の電気泳動はポリアクリルアミドゲルで行なうので、ブロッティングも（今度は面方向に）電気（泳動）的にゲルから膜に移行させます。従って装置としてはブロッティング装置とその電源が必要です。ブロッティング装置には、タンク式とか垂直式と呼ばれている物とセミドライ式・水平式と呼ばれている物があります。当社の「ホライズブロット」は後者にあたります。

タンク式はマイルドな条件でブロッティング効率が良いのですが、溶液中に膜・ゲル・ろ紙のサンドイッチを入れて通電する為ゲルが大きい場合には溶液量が多量に必要だとか、発熱が大きい為冷却装置や大電流（Ａ単位）を流せる専用電源が必要であるとか、短所もありました。セミドライ式はブロッティング溶液をろ紙に含ませるだけなので少量で済み、過電流が流れず、発熱の心配もないので専用電源も必要ありません。

－ブロッティング装置模式図－



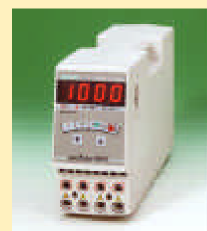
タンク式（垂直式）セミドライ式（水平式）

セッティングも簡単でブロッティング時間も短い、という多くの特長が受け入れられ、数多く使用されるようになりました。

製　品　名	「ホライズブロット2M／4M」	
型　　　式	AE-6687型	AE-6688型
電極サイズ	196x97mm	196x200mm

製　品　名	「パワーステーション1000VC」
型式・出力	AE-8450型　～500mA，～1000V





ブロッティング装置
「ホライズブロット2M/4M」

電源
「パワーステーション1000VC」

3．膜・ブロッティング溶液

ブロッティングメンブラン(膜)、むかしから使われていたのがニトロセルロース膜ですが、近年ＰＶＤＦ（ポリフッ化ビニリデン polyvinyliden difluoride）膜が主流になってきました。当社の「クリアブロット・Ｐ膜」もＰＶＤＦ膜です。これはＰＶＤＦ膜がタンパク質の結合量が多い（タンパク質の種類によるがニトロセルロース膜の２～４倍)、保持力が強い（一度着いたものが剥がれにくい)、丈夫で扱い易いという特長が受け入れられたからでしょう。耐薬性もありアミノ酸シークエンスが可能なので、泳動（分離）→ブロッティング（膜へ）→シークエンス（アミノ酸決定）も定法になっています。安価なニトロセルロース膜とうまく使い分けている人もいます。よくご質問を受けることですが、当社の「クリアブロット・Ｐ膜」は見た目に若干差のあることはありますが､材質的には表裏はありません。また、ブロッティング後に膜を乾燥して保存する方法がありますが､疎水性のＰＶＤＦ膜では再親水化処理が必要となる為お薦めしていません。一晩程度ならブロッキング溶液中で、１～２日ならごく少量のブロッキング溶液と一緒にラップ等で包んで乾かないようにしておけば､冷蔵庫に入れて保存することは可能です。長期にわたる保存で（他の理由でも）乾燥してしまった場合は、再度メタノール処理（メタノール液に１０秒程度浸す）を行なってから緩衝液（ブロッキング溶液、洗浄液）に浸すか、緩衝液に終濃度0．1%程度になるよう界面活性剤（Tween-20、Triton-Xなど）を加えて浸します（若干時間を要する場合もあります)。いずれにせよ膜上のタンパク質の抗原性については保証できませんので、予備実験をお薦めします。親水化したらあとは通常操作に移ります。

製　品　名	「クリアブロット・Ｐ膜」		
材　　　質	ＰＶＤＦ		
型　　　式	AE-6665型	AE-6666型	AE-6667型
サ　イ　ズ	85x90mm	130x140mm	260mmx３m
ポアサイズ	0．2μm		

当社附属のろ紙（アブソーベントペーパー）は清潔（コンタミネーションを防ぐ）で、きめ細やかな厚め（0.9mm厚）のものを使用し、緩衝液量を十分に保つようになっています。他のろ紙、特に薄いものを使用する場合には緩衝液量に注意して下さい。

２枚以上積層してブロッティングする場合にコンタミネーション（陰極側ゲル中タンパク質の混雑）を防ぐ為に透析膜やセロハンを用います。これらは市販されている一般的なもので構いません。

4．ブロッティング溶液

ブロッティング溶液はセミドライ式ではトリスと6-アミノカプロン酸、メタノールの系で３種類の溶液を使用します。トリスと6-アミノカプロン酸のイオンでタンパク質をサンドイッチし陽極側へ引っ張っていくことから、ムラなくブロッティングされると言われています。また、３種の異なる液を使用することから電圧もかかり、ゲルからタンパク質が抜け易くなっていると思われます。 グリシンが入っていない為アミノ酸シークエンスにも有効です。メタノールはタンパク質の膜への吸着力を高める作用がある為使用されます。ただし、逆にタンパク質をゲル中に固定させる作用もある為、濃度があまり高いとゲルからタンパク質が抜けにくくなり転写効率を落とす要因にもなります。通常５～２０％ぐらいで使用しますが、吸着力の強いＰＶＤＦ膜では５％をお勧めしています。ペプチドのような低分子量の場合２０％を使用することもあります。

よく聞くトリス-グリシン-メタノールの系はむかしからの垂直（タンク）式のＴｏｗｂｉｎの方法からきているもので、セミドライ式には最適とは言えません。どうしても、ということであれば100mMトリス（25mMを変更）、192mMグリシン、５％メタノール（20%を変更）で実施してみて下さい。ただし効率は落ちるかもしれません。

5．操作

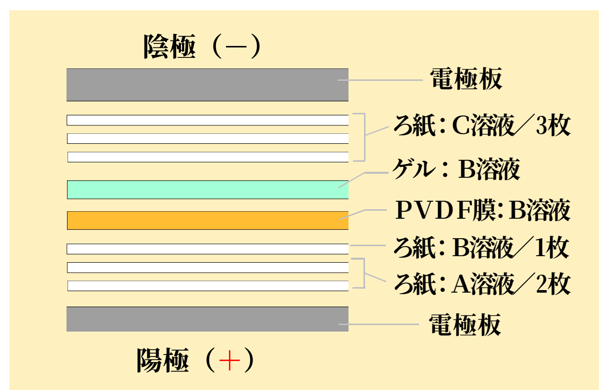
実験例（セミドライブロッティング）　＊詳細は取扱説明書をご覧下さい

ブロッティング溶液（AE-1460 ***EzBlot***）

A溶液：0.3M トリス、5% メタノール
B溶液：25mM トリス、5% メタノール
C溶液：25mM トリス、
　40mM ６－アミノカプロン酸、
　5% メタノール

条　件：144mA（２ mA/cm²）定電流
　（25 ～ 35v）、30 分間

装　置：AE-6677S ホライズブロット、
　AE-8450 パワーステーション 1000VC



実験手順

①上記ブロッティング溶液を調製します。Ａ～Ｃ液各１００ ｍｌ調製すれば、ミニゲル１～２枚、または、スラブゲル１枚分のブロッティングが可能です。

②ＰＶＤＦ膜、ろ紙をゲルと同じ大きさに切ります。（アトーの付属品はゲルと同じ大きさです）

③ＰＶＤＦ膜はメタノールで湿潤した後、Ｂ溶液に浸し、３０分以上振とうします。

④上の図のように浸すバッファーの種類を間違えないようろ紙を用意し、陽極板の上に気泡を入れないよう順番にろ紙、膜、ゲルを重ねます。最後にグローブをはめた手のひらで全体を押し出すように気泡を抜き、膜とゲルを密着させます（６－５写真参照）。

⑤一番上のろ紙にＣ液を滴らし、陰極板をセットし、リード線をつなぎます。

⑥電源を設定し、定電流２ mA/cm² ゲル面積（ミニゲルなら 144mA 定電流、50V（パワーステーションのブロッティングモード設定））で、通電を開始します。

⑦ 30 ～ 40 分後ブロッティングを終了します。膜を取り出し検出反応（抗原抗体反応）に移ります。

6．ブロッティングのコツ

ブロッティングには以下の要因がかかわってきます。うまくいかない時などのご参考に！

6－1．ブロッティング溶液組成

セミドライブロッティングの原法*[1]ではトリスと6-アミノカプロン酸、メタノールの系で３種類の溶液を使用します。トリス－グリシン－メタノールの系は従来からの垂直（タンク）式のTowbinの方法からきているもので、セミドライ式には最適とは言えません。トリスと6-アミノカプロン酸、メタノールの系はトリスと6-アミノカプロン酸のイオンでタンパク質をサンドイッチし陽極側へ引っ張っていくことから、ムラなくブロッティングされると言われています。また、３種の異なる液を使用することから電圧もかかり、ゲルからタンパク質が抜け易くなっていると思われます。尚、原法ではメタノール濃度が２０%になっていますが、メタノールはゲルからタンパク質が抜けにくくなる作用がある*[2]為、弊社では５%にしています。泳動後のゲルはブロッティング溶液に置換しないでください。

*1：Kyhse-Andersen, J. (1984) J. Biochem Biophys. Methods, 10, 203-209.

6－2．メタノール濃度（＊２）

メタノールはタンパク質をゲル中に固定させる作用があります。従って濃度があまり高いとゲルからタンパク質が抜けにくくなります。当然２０%＜１０%＜５%とタンパク質がゲルから出易くなります。ところがメタノールはタンパク質の膜への吸着を高める作用もある為必要なものでもあります。低分子（ペプチド等）試料やニトロセルロース膜（ＰＶＤＦ膜より吸着力が弱い*[3]）を使用する場合のみ１０～２０%メタノールをお薦めしています。

6－3．ブロッティングメンブラン（転写膜）（＊３）

従来使われてきたブロッティングメンブラン（膜）はニトロセルロース膜が主流でしたが、現在ではＰＶＤＦ膜が出てから操作性の良さ、吸着力・結合保持力の高さなどから広く使われるようになり、こちらが主流となっています。ＰＶＤＦ膜はタンパク質の吸着力や保持力が優れているためブロッティング溶液中のメタノール（タンパク質の膜への吸着を高める作用がある）濃度を低くしブロッティング効率を上げる（タンパク質がゲルから出易くなる）ことができます。

6－4．通電

セミドライブロッティングでは一定電流１～２mA／cm^2で３０～９０分行なうのが標準です。電圧は電極間距離に比例して設定する為積層式のセミドライブロッティングでは再現性が得難く、通電（ゲル）面積に比例する電流を用いるのです。電流値を上げたり単に通電時間を延ばしてもブロッティング効率はあまりあがりません。かえって電気浸透により効率が落ちたり電圧上昇により発熱等をおこしてしまいます。効率が悪い場合はまずブロッティング溶液*[6－1. 6－2. 6－6]について検討してみて下さい。

6－5．パターンが流れる



（陰極側）ろ紙とゲルを同じ大きさに揃えるのは基本として、多くの場合ゲルとブロッティングメンブラン（膜）との接触が不十分な為に起こります。セミドライブロッティングではゲル・膜・ろ紙をセッティング後、上からしっかり押さえて下さい。
コツはこれだけです。
ゲルはちょっとやそっとではつぶれませんからご安心を。

6－6．でもブロッティング効率が悪い

分子量の大きいタンパク質や塩基性タンパク質、糖タンパク質・リポタンパク質はブロッティング効率が悪い場合があります。上記のような検討をしても効率に改善がみられない場合には陰極側転写溶液に0．01～0．02%SDSを添加します。あまり濃度が高いとタンパク質の膜への結合を妨げてしまいます。通電時間を延ばす場合は９０分後一度通電を止め新しいブロッティング溶液を膜にかけてから（ゲル・膜をずらさないように）再度通電して下さい。ゲル濃度を下げるのも一つの手です。また泳動後のゲルをブロッティング溶液に置換しないだけでもブロッティングされ易いです。

7．検出

通常、目的とする試料（タンパク質）だけを検出、つまり特異的検出を行ないます。が、その前に・・・全試料（タンパク質）やブロッティング条件の確認等を目的として非特異的検出（染色）を行なう場合もあります。一般にゲルの染色に使われるＣＢＢ（クマシーブリリアントブルー）の色素染色を一例として紹介しておきます。

実験例（ＣＢＢ染色）　　＊詳細は取扱説明書をご覧下さい

染色液 ＊1

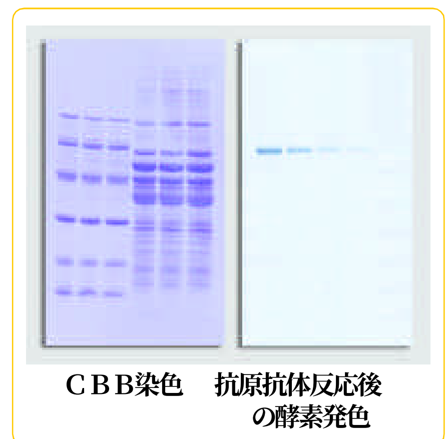
0.001%ＣＢＢ、10%酢酸、30%メタノール

脱色液 ＊2

10%酢酸、50%メタノール

＊1　通常ゲル染色に用いるＣＢＢの1/10～1/100薄い。

＊2　メタノール濃度が５０%程度であること。
（10%酢酸、30%メタノール100mLにメタノール45mLを加えると終濃度約52%。酢酸濃度が薄くても問題なし。）



ＣＢＢ染色　抗原抗体反応後の酵素発色

実験手順

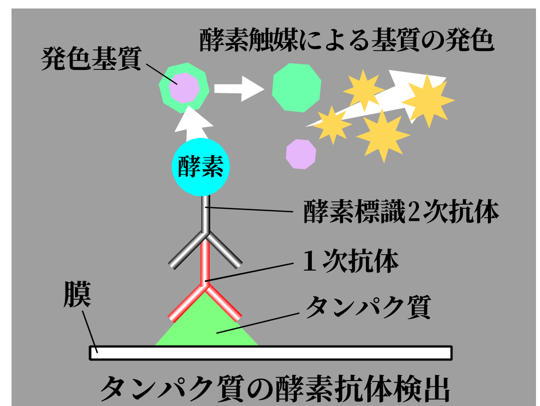
染 色	5～10分	1回	ゆっくり
↓			
脱 色	2～5分	2回	激しく
↓			
検出			

＊ バックグランドが若干青いままでも乾燥すると白くなる。

●目的のタンパク質の特異的検出

通常、ブロッティング後タンパク質の目的とするものだけを検出（特異的検出）します。

一般的には、まず膜自体が反応(発色･光)しないようにブロッキングを行ない、洗浄後目的タンパク質に対する抗体（一次抗体）を結合させさらに発色・光系の酵素等を標識した抗体（二次抗体）を結合させて、基質を加えて発色・発光させます。



実験例（抗原抗体法）　　＊詳細は取扱説明書、文献等をご覧下さい

ブロッキング溶液

AE-1470　*EzBlock*（イージーブロック）（非タンパク質性）

または　ＢＳＡ、スキムミルク、カゼイン／ＴＢＳＴなど

洗浄液＊1

AE-1480　*EzWash*（イージーウォッシュ）＋ Tween-20

ＴＴＢＳ（Tris-HCl,NaCl,Tween-20）濃度やpHは各種条件あり

（標識）抗体

ＨＲＰ（西洋わさびペルオキシダーゼ）＊2 標識ＩｇＧ（×1/1000）／ＴＴＢＳ

基 質＊3

AE-1490　*EzWestBlue*（イージーウエストブルー）（ＴＭＢ発色基質）　→　発色

ＤＡＢ（ジアミノベンジジン），H_2O_2　→　発色

ＥＣＬ[TM]（アマシャム社，発光試薬）など　→　発光

＊1 バックグランドを下げる為に界面活性剤Tween-20を加えている。
＊2 他にＡｌｐ（アルカリフォスファターゼ）等の酵素も用いられる。
＊3 発色・発光いずれもの場合も基質には多数種類がある。
　メーカーによっても発色・発光強度、発光継続時間、試薬の安定性などが異なる。
＊ バックグランドが高い場合は、ブロッキングを３７℃で行なったり、各洗浄時間を長くする。

実験手順

洗浄	5分	2回	激しく	
↓				
ブロッキング	60分	1回	ゆっくり	通常は室温で行う
↓				
洗浄	5分	2回	激しく	条件によっては10～30分
↓				
抗体反応	60分	1回	ゆっくり	37℃または室温で行う
↓				
洗浄	1分	2回	激しく	
↓				
洗浄	10分	2回	激しく	条件によっては20～30分
↓				
検出	発色・発光			

2次抗体は抗体反応→洗浄→洗浄を繰り返します。

＊ 詳細は別途「化学発光検出のコツ　ウエスタンブロッティング編」をご参照ください。
ご希望の方には差し上げます。当社までご請求ください。

発光検出

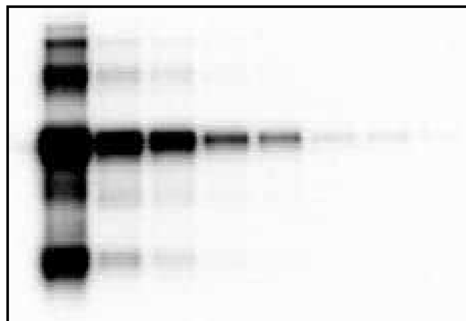
最近ではウエスタンブロッティングの検出には発光検出が多く利用されています。抗原抗体反応を用いた場合、２次抗体にペルオキシダーゼ(POD/HRP)を標識したものを用いれば、最後に発光基質を添加することで発光検出が行えます。この発光は微弱なため、目で見ることは出来ないのでＸ線フィルムや高感度冷却CCDカメラを用いてパターンを取り込みます。現在では操作が容易で、簡単にデジタル化が可能な冷却CCDカメラシステムが広く使われるようになってきました。この装置は、発光基質を添加したメンブランを暗箱内にセットし、一定時間撮影するだけで発光パターンを取り込むことが可能です。



アトー冷却CCDカメラシステム
AE-6981/2 ライトキャプチャーII

実際に発光検出を行った膜のイメージ

試　　料：血清
検 出 系：抗Alb-HRP標識抗体
　　　　　基質を添加し 発光
撮　　影：アトー ライトキャプチャー

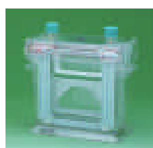


8．システム紹介

製品の詳細はカタログ、ホームページをご覧ください

「non-RIウエスタンブロッティングシステム」発色・化学発光法によるタンパク質の検出

電気泳動



泳動槽
AE-6530P
ラピダス・二連ミニスラブ電気泳動槽
\42,000



既製ゲル
E-T520L
e・パジェル
\13,800
(ゲルは各種あり)



試料調製溶液
(SDS-PAGE用)
AE-1430 *EzApply*
(イージープライ)
\6,800

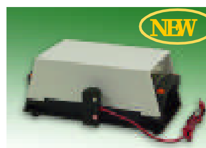


泳動用緩衝液
(SDS-PAGE用)
AE-1410 *EzRun*
(イージーラン)
\4,800



電源
AE-8450
パワーステーション1000VC
\150,000

ブロッティング



NEW

ブロッティング装置
(ろ紙・膜付き)
AE-6687・S
ホライズブロット2M
\125,000



ブロッティング用溶液
(3種溶液系)
AE-1460 *EzBlot*
(イージーブロット)
\12,000



振とう器
シーソーシェーカーミニ
\74,000

検出



ブロッキング用溶液
(非タンパク質性)
AE-1470 *EzBlock*
(イージーブロック)
\5,800



洗浄用溶液
(TBS溶液)
AE-1480 *EzWash*
(イージーウォッシュ)
\6,800



発色基質溶液
(HRP用発色基質)
AE-1490 *EzWestBlue*
(イージーウエストブルー) \12,000

発光撮影装置
AE-6981/2
ライトキャプチャーII
\2,300,000～



その他、消耗品（試薬類）などが別途必要になります。

2009.5